槲皮素对黄粉虫血淋巴酚氧化酶的生理效应

刘守柱，肖 婷，薛超彬，罗万春*

（山东农业大学植物保护学院，农药毒理与应用技术省级重点实验室，山东泰安 271018）

摘要：用酶标仪法测定了槲皮素对黄粉虫 *Tenebrio molitor* 酚氧化酶（phenoloxidase，PO）的生物活性。结果表明：在离体条件下，对黄粉虫血淋巴 PO 的 IC_{50} 为 0.625 mmol/L。在活体情况下，当槲皮素-DMSO 溶液或槲皮素水悬浮液（5 μL）注入虫体后，在浓度低于 1.0 mmol/L 时对黄粉虫血淋巴 PO 具有激活作用，当浓度高于 2.0 mmol/L 时则对 PO 具有明显的抑制作用；单独注射 5 μL DMSO 溶液对 PO 活性亦有一定的激活作用。试虫被注射槲皮素后，PO 活性在 2～4 h 内迅速下降，然后缓慢上升，处理 8 h 左右达到最高点，其后低浓度处理 PO 活性保持不变，而高浓度处理则逐渐下降，提示低浓度槲皮素可以引起试虫的免疫反应。在 PO 测活体系中加入 0.5%的 BSA 后对 PO 活性无影响，并能使槲皮素在测活体系中保持稳定。

关键词：黄粉虫；槲皮素；酚氧化酶；生理效应

中图分类号：Q965 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2007)12-1201-06

Physiological effect of quercetin on phenoloxidase from *Tenebrio molitor*

LIU Shou-Zhu，XIAO Ting，XUE Chao-Bin，LUO Wan-Chun*（College of Plant Protection，Shandong Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Application Technique，Shandong Agricultural University，Tai'an，Shandong 271018，China）

Abstract：The physiological effect of quercetin on phenoloxidase (PO) from *Tenebrio molitor* was determined *in vitro* and *in vivo*. The results showed that the inhibition concentration showing 50% of the maximum inhibition (IC_{50}) was 0.625 mmol/L. The PO activity of hemolymph *in vivo* was increased when the quercetin-DMSO solution or quercetin-water suspension (5 μL) with concentration of 0.2－1.0 mmol/L was injected into the larvae of *T. molitor*；but the compound would decrease the PO activity when the concentration of quercetin was above 2.0 mmol/L. In addition，the PO activity was also increased when DMSO (5 μL) was injected into the tested insect *in vivo*. During 2－4 hours after injection of quercetin into the body of the insect，the PO activity was decreased rapidly，then went slowly up and reached the highest level 8 h after injection of the compound，and then dropped again except the low concentration treatment. The results suggest that quercetin at low concentration can cause immune response to the tested insect. When 0.5% BSA was added to the assay system，it had no effect on the PO activity，but could prevent quercetin from sedimentating.

Key words：*Tenebrio molitor*；quercetin；phenoloxidase；physiological effect

酚氧化酶（phenoloxidase，PO，EC1.14.18.1），又称酪氨酸酶（tyrosinase），是昆虫体内一类重要的氧化酶，在昆虫的正常发育过程中具有重要的生理功能：参与表皮的硬化、黑化过程；参与对外来侵染物的免疫防御反应；参与伤口愈合反应（Theopold *et al*.，2004）。目前，有关 PO 的生理、生化特性以及其在昆虫体内的调控机制的研究都有了很大的进展（Sugumaran，2002；Decker and Jaenicke，2004）。在果品保鲜与人体美白等领域，以 PO 为靶标的抑制剂研究在上世纪 60 年代就已开展（Palmer and Roberts，1967；Prabhakaran *et al*.，1968）。Prabhakaran 等（1969）研究了多种抑制剂对麻风分枝杆菌 *Mycobacterium leprae* 酚氧化酶的抑制效果，发现二硫代氨基甲酸盐（diethyldithiocarbamate）在较低的浓度

基金项目：国家自然科学基金项目（30571237）

作者简介：刘守柱，男，1971 年生，博士研究生，从事农药毒理学与天然源产物农药研究，E-mail：liushouzhu@sohu.com

* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：wcluo@sdau.edu.cn

收稿日期 Received：2007-04-20；接受日期 Accepted：2007-09-17

(0.5 mmol/L),可以 100%抑制 PO 活性;此外,研究还发现铜离子络合剂类的抑制剂效果要好于底物类似物抑制剂。在最近的研究中,发现许多植物来源的化合物对 PO 有较强的抑制作用,其中槲皮素对菜青虫 *Pieris rapae* 酚氧化酶(薛超彬,2004)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 酚氧化酶(罗万春等,2005)和槐尺蠖 *Semiothisa cinerearia* 酚氧化酶(Wang *et al*.,2005)均有较强的抑制作用,但该抑制剂对活体昆虫 PO 的生理效应与免疫反应等作用尚未见报道。

昆虫是复杂的生命有机体,在长期的进化过程中形成了其独特的防御机制,可以特异地识别入侵的病原菌及异物(Theopold *et al*.,2004;Brown and Gordon,2005),并通过免疫反应和代谢反应将之清除,以保持机体健康。任何异物在进入昆虫体内后都会引起昆虫一系列的防御反应,PO 抑制剂亦是如此。在体外对 PO 具有抑制效果的化合物进入虫体后是否还能保持较好的抑制效果?其产生的生理效应如何?会对昆虫的免疫系统产生什么样的影响?这些问题均有待通过昆虫活体试验得以阐述,也是本实验探索的出发点与目的。研究结果能使我们更深刻地认识害虫与 PO 抑制剂之间内在的互动关系,对开发以酚氧化酶为靶标的‘新型害虫控制剂”提供理论依据和实践指导。

1 材料与方法

1.1 试虫与饲养

供试昆虫黄粉虫 *Tenebrio molitor*,参照 Lee 等(2000)方法饲养。室内温度 25℃ ± 1℃,相对湿度 20% ± 5%,以麦麸作饲料,上覆甘蓝叶片以提供水分。

1.2 试剂及仪器

槲皮素和 L-3,4-二羟基苯丙胺(L-DOPA)均为 Sigma 产品,其他试剂均为国产分析纯试剂。雷勃 MK3 酶标仪为上海热电公司产品。

1.3 试虫处理

(1) 将槲皮素用二甲基亚砜(DMSO)溶解,配制成 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0 mmol/L 的溶液备用。挑取生长发育一致的标准黄粉虫幼虫 10 头,置于冰块上使其冷冻麻痹,取浓度 0.2 ~ 10.0 mmol/L 的槲皮素各 5 μL,用消毒的微量进样器从试虫腹部末端第 3 节注入虫体,最后置于养虫盒内饲养。对照设 2 组,一组为溶剂对照,注射 5 μL DMSO;另一组为自然对照,不注射任何试剂;与处理一样,2 组对照均在冰块上冷冻相同时间,然后转入养虫盒内饲养。以上各处理及对照均重复 4 次。(2)先将槲皮素与蒸馏水混合,用超声波细胞破碎仪进行超声处理,超声功率 600 W,工作 60 s,间隙 10 s,超声处理 10 次,制成 32.0 mmol/L 的悬浮液,备用。挑取生长发育一致的标准黄粉虫幼虫 10 头,置于冰块上使其冷冻麻痹,取稀释后浓度为 16.0,8.0,4.0,2.0,1.0,0.5,0.25 mmol/L 的上述悬浮液 5 μL,注入黄粉虫幼虫体内。对照设 2 组,一组以水为对照,另一组为自然对照,只经冰冻处理。重复 4 次,方法同上。

1.4 黄粉虫血淋巴的采集及 PO 活性的活体测定

黄粉虫血淋巴的采集方法参照 Moret 和 Siva-Jothy (2003),并略有改进,即:用消毒细针在试虫前胸背板上扎一个小孔,用校准的毛细玻璃管收集溢出的血淋巴(每头幼虫收集 10 μL),吹入含有预冷的 1 mL 磷酸缓冲液(20 mmol/L,pH 6.5)的塑料离心管中进行稀释,冰浴保存。

在注射槲皮素 24 h 后提取黄粉虫血淋巴,立即进行 PO 活性测定,重复 3 次。PO 活性测定采用酶标仪微量测定法(雷质文等,2001)。在 96 孔酶标板各孔中加入 40 μL 稀释的血淋巴,再加入 160 μL 10 mmol/L 的 L-DOPA,振荡 5 s,在酶标仪上测定 490 nm 处吸光密度值,每 20 s 记录 1 次,选取线性增长阶段的曲线斜率作为酶的相对活力。酶活力单位定义为每 20 s 光密度增加 0.0001 为一个活力单位。

1.5 槲皮素对黄粉虫血淋巴 PO 活性抑制作用的测定

取试虫 10 头,按 1.4 节方法采集血淋巴,在 4℃,5 000 r/min 冷冻离心 10 min,以上清液作为酶源,测定槲皮素对 PO 活性的抑制作用。槲皮素用 DMSO 溶解,配制成 100 mmol/L 的溶液备用。据报道,测活体系中 DMSO 的含量高于 3.3%时会对 PO 有明显的抑制作用(薛超彬,2004),因而不能通过增加 DMSO 的含量来提高槲皮素在测活体系中的溶解度。另外,在实验中发现,在测活体系中加入 0.5% 的牛血清白蛋白(BSA)后可以使槲皮素在测活体系中稳定而不析出,且不会对 PO 活性产生影响,因而在配制好的 10 mmol/L L-DOPA 中加入 0.5%的 BSA 作为槲皮素溶液的稳定剂。

在酶标板各孔内加入 100 mmol/L 的槲皮素,并用 DMSO 补足至 6 μL,使其在 200 μL 的测活体系中浓度分别为 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8,0.9,1.0 mmol/L,然后加入 154 μL 的 L-DOPA 溶液

(含 0.5%BSA)，混匀后加入 40 μL 血淋巴，按 1.4 节方法测定不同抑制剂浓度下 PO 的活性，求出 IC_{50}。

本文所指‘活体’测定是将槲皮素直接注射入虫体后再取血淋巴进行 PO 活性测定；‘离体’测定是将血淋巴取出后，在体外与槲皮素混合，然后测定 PO 活性。

2　结果与分析

2.1　槲皮素对黄粉虫活体 PO 的抑制作用

2.1.1　槲皮素-DMSO 溶液对黄粉虫 PO 活性的影响：以溶剂对照的相对活力为 100%，各剂量浓度处理后的 PO 相对活力大小如图 1 所示。从图中可以看出，在槲皮素浓度低于 0.4 mmol/L 时，PO 相对活力呈上升趋势，然后逐渐下降。当槲皮素浓度高于 1.0 mmol/L时，PO 活力低于溶剂对照，抑制作用较为明显。简言之，当槲皮素浓度低于 1.0 mmol/L 时，在体内对 PO 活力有激活作用；浓度高于 1.0 mmol/L 时，则有抑制作用。DMSO 溶剂对照处理的黄粉虫 PO 活性也高于自然对照处理的。

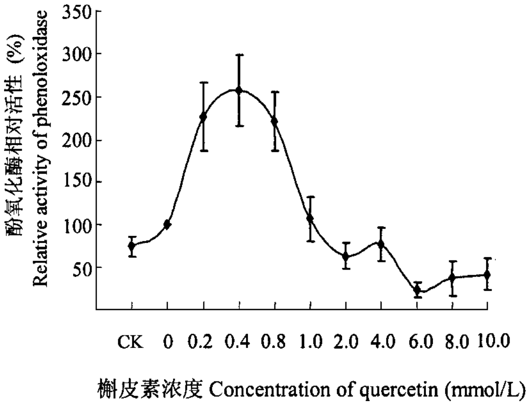

图 1　槲皮素 DMSO 溶液对黄粉虫酚氧化酶活性(活体)的影响

Fig. 1　Effect of quercetin-DMSO on phenoloxidase activity from *Tenebrio molitor in vivo*

CK：自然对照，未注射任何试剂 Without injection；0：溶剂对照，注射 DMSO Injected with DMSO as the control.

2.1.2　槲皮素水悬浮液对黄粉虫 PO 活性的影响：槲皮素水悬浮液对黄粉虫酚氧化酶的影响类似于槲皮素-DMSO 溶液(图 2)。槲皮素浓度低于 0.25 mmol/L 时，PO 活力呈上升趋势，然后逐渐下降。在 0.25 ~ 1.0 mmol/L 浓度下，酚氧化酶的相对活力高于溶剂对照。当槲皮素浓度高于 2.0 mmol/L 时，其活性降低，浓度为 32.0 mmol/L 时，活性大幅下降，仅为对照的 6.59%。从图中还可以看出，随着槲皮素浓度的提高，PO 的相对活力明显呈下降趋势。水对照与自然对照黄粉虫 PO 相对活力接近，活性差异不明显。

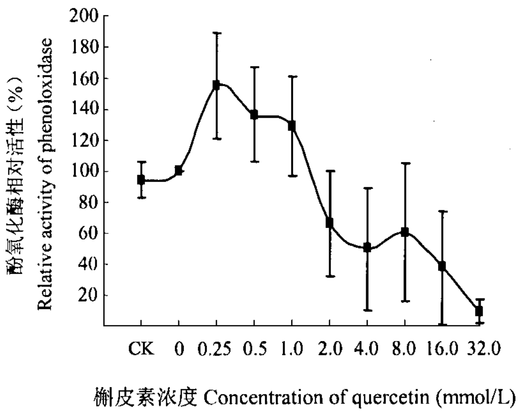

图 2　槲皮素水悬浮液对黄粉虫酚氧化酶活性(活体)的影响

Fig. 2　Effect of quercetin-water on phenoloxidase activity from *Tenebrio molitor in vivo*

CK：自然对照，未注射任何试剂 Without injection；0：溶剂对照，注射水 Injected with water as the control.

2.1.3　槲皮素注射不同时间后 PO 活性的变化：分别将 0.25，1.0，4.0 mmol/L 槲皮素水悬浮液注入虫体 1，2，4，8，16，24 h 后测定 PO 活性(图 3)。结果显示：不同浓度槲皮素在注入虫体后都很快使 PO 活性降低，0.25 mmol/L 处理在注射 2 h 后活性达到最低；1.0，4.0 mmol/L 处理在注射 4 h 后达到最低点，然后逐渐上升。0.25 mmol/L 处理在处理 8 h 后 PO 活性达到高点，并维持在较高点；1.0 mmol/L 处理在注射 8 h 后 PO 活性达到最高点，然后开始下降；4.0 mmol/L 处理在注射 16 h 后 PO 活性最高，然

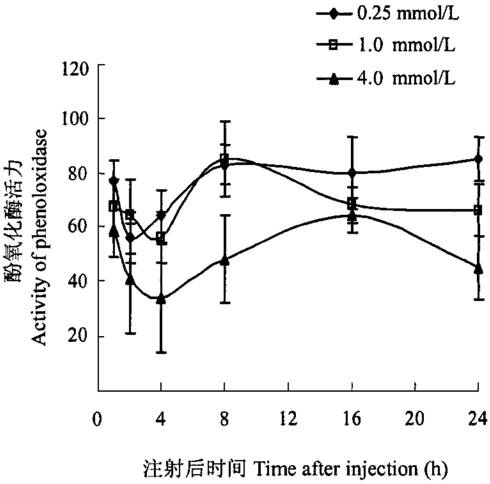

图 3　注射槲皮素不同时间后对黄粉虫酚氧化酶活性的影响

Fig. 3　Effect of quercetin on phenoloxidase activity from *Tenebrio molitor* at different time after injection

后下降,下降幅度较大。

2.2 槲皮素对黄粉虫血淋巴 PO 抑制作用的离体测定结果

在 200 μL 的测活体系中,加入系列浓度的槲皮素,在离体情况下测定 PO 的活力,结果如图 4 所示。可以看出,槲皮素浓度为 0.1 mmol/L 时,对 PO 活性抑制作用较小,但随着槲皮素浓度逐渐增大,其抑制作用则逐渐加强。槲皮素对黄粉虫血淋巴 PO 的 IC_{50} 为 0.625 mmol/L。

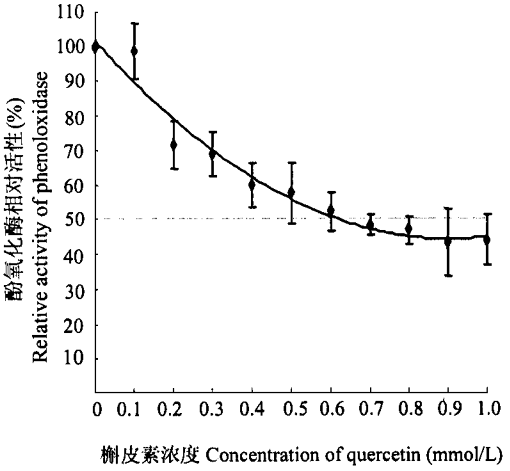

图 4 槲皮素对黄粉虫血淋巴酚氧化酶的 IC_{50}
Fig. 4 IC_{50} of quercetin on phenoloxidase activity from *Tenebrio molitor*

在本实验中为使槲皮素不析出,在测活体系中加入了 0.5% 的牛血清白蛋白(BSA)。经测定,加入 BSA 后 PO 相对活力为 362.75,不加 BSA 时 PO 相对活力为 366.25,两者无显著差别。

3 结论和讨论

昆虫具有开放式的循环系统,与此相适应,其免疫系统是内源免疫系统(innate immunity),与脊椎动物的获得性免疫系统(adaptive immunity)(Theopold *et al*.,2004)不同。在昆虫体内的内源免疫系统中,PO 具有非常重要的作用,它可将血淋巴中的酚氧化成醌,进而在其他酶促条件下形成对入侵病原物有毒杀作用的黑色素。正是由于 PO 在昆虫免疫系统中的重要作用,针对 PO 及其酶原(prophenoloxidase,PPO)的抑制、激活、调控研究已成为昆虫生理、生化领域的研究热点。

经过几年的探索,我们实验室发现了多种对不同昆虫 PO 具有较强抑制作用的抑制剂,槲皮素就是其中具有代表性的一例。研究结果表明它是一种竞争性抑制剂,对槐尺蠖、菜青虫、广肩星天牛幼虫的离体酚氧化酶均有很强的抑制作用(薛超彬,2004;Wang *et al*.,2005;叶雅杰,2006)。在前期工作的基础上,本研究比较了槲皮素对黄粉虫 PO 的活体和离体抑制作用,特别是在活体条件下该化合物对试虫的生理效应,发现该化合物在两种情势下对试虫酚氧化酶都具有较强的抑制作用。在离体情况下,对黄粉虫酚氧化酶的 IC_{50} 约为 0.625 mmol/L,逊于对菜青虫酚氧化酶的 IC_{50}(0.13 mmol/L)(薛超彬等,2004)和对槐尺蠖酚氧化酶的 IC_{50}(0.115 mmol/L)(Wang *et al*.,2005),其原因可能是本实验中所用酶源来源于试虫的血淋巴,提取后立即测定,并未进行纯化,在体外存放时间较短;而先前报道的菜青虫、槐尺蠖酚氧化酶是经整体匀浆后提取,并经离心、透析与柱层析纯化,离体存放时间较长;同时,不同来源 PO 的性质可能也存在一定的差异。

采取试虫活体,在提取血淋巴后立即测定酶活性,不经离心处理,保留了其体内的所有成分,最大限度地接近昆虫活体的真实状况,是本实验的一个显著特点。但是由于不同生物个体之间生理状况差异较大,因而所得的试验数据变化也较大(图 1~3)。活体测定结果表明,槲皮素在低浓度时可以提高 PO 活性,但在高浓度时则对 PO 活性具有抑制作用。

将槲皮素注入虫体后,在不同的时间段内,其活性有不同的变化趋势,并且不同浓度下变化趋势亦不相同。由图 3 可以看出,24 h 时 PO 活力随槲皮素浓度的增高而降低,与图 1 及图 2 表现出的规律相似,即在低浓度时表现刺激作用,而在高浓度时表现抑制作用。本实验结果与报道的久效磷对中国对虾 *Penaeus chinensis* 血淋巴 PO 的影响相近:低浓度久效磷短时间胁迫,对中国对虾血淋巴的 PO 活力有刺激增强的作用;增大药物浓度和延长胁迫时间,可使其活力降低(白洁等,1998)。

槲皮素在低浓度时的这种刺激作用类似于病原微生物对 PO 的激活作用。一般来说,昆虫可以特异地识别入侵的病原物,如细菌、真菌、线虫等,并开启免疫防御系统来吞噬入侵者,在此过程的初始阶段,酚氧化酶酶原(PPO)被活化成具有活性的酚氧化酶(PO),然后将酚类物质氧化,并在其他酶的催化下,经过一系列复杂的生化过程,最终聚合成有毒的黑色素将病原物隔离或杀死(Ashida and Brey,1995;Brown and Gordon,2005)。有些农药品种,如氟啶脲也可以刺激昆虫体内的 PO 活性显著增高

(吴刚和尚稚珍,1992)。在本研究中,槲皮素实际上是作为一种外来物质进入虫体的,也可能被虫体内的某种识别因子识别,启动免疫系统,PPO 被活化成 PO,使 PO 含量增加,表现出来就是 PO 活性升高。在注射后 2～4 h 内,由于 PO 不断沉积在槲皮素颗粒周围,使血淋巴中 PO 含量降低,而血淋巴中的槲皮素浓度不断升高,导致 PO 活力迅速下降;随着 PPO 被大量活化形成 PO,PO 含量缓慢升高,表现出 PO 活力逐渐增加;随着 PPO 级联反应的进行,PPO 含量越来越少,其活化速度开始下降,PO 活力亦随之下降(图 3)。另外,昆虫的免疫防御机制是一个十分精密而复杂的系统,部分的槲皮素可能在昆虫体内经过代谢途径被排出体外,所以槲皮素在低浓度时表现为激活作用;而随着浓度的提高,其在昆虫体内的积累越来越多,不能被完全有效的代谢或降解,则表现为对 PO 活性具有抑制作用,这种抑制作用随着浓度的增加而增强(图 1,2)。同时,槲皮素在低浓度时对 PO 的这种激活作用仅仅存在于活体测定中,而在离体测定中(离心后测定,图 4)则不存在此现象,只对 PO 表现出抑制作用,此结果表明其作用机制不同于已知的病原物对 PO 的激活机制(Ma and Kanost, 2000; Ochiai and Ashida, 2000)。

通过比较溶剂对照与自然对照的 PO 活性可以看出(图 1),DMSO 溶剂对照的 PO 活性要明显高于自然对照,说明 DMSO 在注射入虫体后对 PO 有激活作用,其原因可能是 DMSO 作为一种免疫刺激因子与昆虫体内的受体因子结合,经过系列的生化过程将 PPO 活化为 PO,或者与 PPO 结合使其构象发生改变而暴露活性中心,从而使 PO 活性高于自然对照。以水作为溶剂时,其溶剂对照的 PO 活性与自然对照相近(图 2),说明注射水并不会引起 PO 活性的升高,这也是为什么注射低浓度的槲皮素 DMSO 溶液后其相对活性要高于注射低浓度槲皮素水悬浮液的原因。

在 PO 的测活体系中,加入 0.5%左右的 BSA 可以有效地稳定槲皮素,使其在测活体系中不会结晶析出,原因是槲皮素分子的部分片段可以插入 BSA 分子的内部,二者通过疏水作用力结合,自由能降低(王春等,2006),使得溶解度增大。

参 考 文 献 (References)

Ashida M, Brey PT, 1995. Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 10 698－10 702.

Bai J, Li YQ, Li KR, 1998. Study on the effect of monocrotophos on activity of PO in haemolymph of *Penaeus chinensis*. *Marine Sciences*, (3): 35－37. [白洁, 李永祺,李岿然, 1998. 久效磷对中国对虾血淋巴酚氧化酶活力影响的初步研究. 海洋科学, (3): 35－37]

Brown GD, Gordon S, 2005. Immune recognition of fungal β-glucans. *Cellular Microbiology*, 7(4): 471－479.

Decker H, Jaenicke E, 2004. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 673－687.

Lee KM, Lee KY, Choi HW, Cho MY, Kwon TH, Kawabata S, Lee BL, 2000. Activated phenoloxidase from *Tenebrio molitor* larvae enhances the synthesis of melanin by using a vitellogenin-like protein in the presence of dopamine. *Eur. J. Biochem.*, 267: 3 695－3 703.

Lei ZW, Huang J, Yang B, Zhang LJ, Yu KK, 2001. A 96-microtitor plate method for detection of antimicrobial activity and phenoloxidase activity of haemolymph supernatant of *Penaeus chinensis*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 32(4): 33－37. [雷质文, 黄捷, 杨冰, 张立敬, 俞开康, 2001. 96 孔酶标板法测定中国对虾血淋巴上清液抗菌活力和酚氧化酶活性的初步研究. 海洋湖沼通报, 32(4): 33－37]

Luo WC, Gao XX, Yu TC, Wang SD, 2005. Inhibitory effect of quercetin on the activity of phenoloxidase in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 48(1): 36－41. [罗万春, 高兴祥, 于天丛, 王树栋, 2005. 栎皮酮对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制作用. 昆虫学报, 48(1): 36－41]

Ma CC, Kanost MR, 2000. A β-1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *Journal of Biological Chemistry*, 275(11): 7 505－7 514.

Moret Y, Siva-Jothy MT, 2003. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270: 2 475－2 480.

Ochiai M, Ashida M, 2000. A pattern-recognition protein for β-1,3-glucan: the binding domain and the cDNA cloning of β-1,3-glucan recognition protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5): 4 995－5 002.

Palmer JK, Roberts JB, 1967. Inhibition of banana polyphenoloxidase by 2-mercaptobenzothiazole. *Science*, 157: 200－201.

Prabhakaran K, Harris EB, Kirchheimer WF, 1969. Effect of inhibitors on phenoloxidase of *Mycobacterium leprae*. *Journal of Bacteriology*, 100(2): 935－938.

Prabhakaran K, Kirchheimer WF, Harris EB, 1968. Oxidation of phenolic compounds by *Mycobacterium leprae* and inhibition of phenolase by substrate analogues and copper chelators. *Journal of Bacteriology*, 95(8): 2 051－2 053.

Sugumaran M, 2002. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res.*, 15: 2－9.

Theopold U, Schmidt O, Derhäll KS, Dushay MS, 2004. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends in Immunology*, 25(6): 289－294.

Wang C, Wu QH, Wang Z, Chen DG, 2006. Interaction of quercetin and

bovine serum albumin. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 26(9): 1 672–1 675. [王春，吴秋华，王志，陈大刚，2006. 槲皮素与牛血淋巴白蛋白相互作用的研究. 光谱学与光谱分析，26(9): 1 672–1 675]

Wang XY, Liu CY, Zhang JD, Luo WC, 2005. Inhibitory kinetics of quercetin on phenoloxidase from loopworm. *Insect Science*, 12: 231–240.

Wu G, Shang ZZ, 1992. Effect of chlorfluazuron on the phenoloxidase and chitinase activity in *Ostrinia furnacalis*. *Acta Entomol. Sin.*, 35(3): 306–310. [吴刚，尚稚珍，1992. 抑太保对亚洲玉米螟表皮酚氧化酶及几丁质酶活力的影响. 昆虫学报，35(3): 306–310]

Xue CB, 2004. Properties of Phenoloxidase (PO) from *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae) and the Inhibitory Effect on PO Activity by Some Inhibitors. MSc Thesis, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong. [薛超彬，2004. 菜青虫酚氧化酶性质及抑制剂对其活性的抑制作用研究. 山东泰安：山东农业大学硕士学位论文]

Ye YJ, 2006. Research in the Affection of Quercetin, Curcumin and the Other Six Effections on Motsoh Larva' PPO. MSc Thesis, Northeast Normal University, Changchun, Jilin. [叶雅杰，2006. 姜黄素、槲皮素等八种效应物对光肩星天牛幼虫 PPO 影响的试验研究. 吉林长春：东北师范大学硕士学位论文]

（责任编辑：黄玲巧）